

## ASPECTOS MORFOLOGICOS DE LA ESPERMIOGENESIS TIPICA DE *MUREX BRANDARIS*

### MORPHOLOGICAL FEATURES IN THE *MUREX BRANDARIS* TYPICAL SPERMIOGENESIS

M.J. AMOR y M. DURFORT (\*)

#### RESUMEN

En la espermiogénesis típica de *Murex brandaris* el núcleo, inicialmente redondeado, y con un patrón de cromatina granular, se alarga progresivamente y la cromatina adquiere una típica disposición laminar.

El núcleo inicia una rotación sobre su eje principal, que provoca, por contacto, la fusión de las láminas de cromatina culminando el proceso en un núcleo alargado y altamente electrodenso.

El centriolo, ubicado en la base nuclear, cercano al condrioma y al complejo de Golgi, origina un axonema que asciende a través de un canal que surca el núcleo hasta su ápice.

El condrioma, formado en los primeros estadios por mitocondrias aisladas, se fusiona originando unas bandas que se disponen helicoidalmente alrededor del axonema, dando lugar a la pieza media del espermatozoide.

El complejo de Golgi, con posición basal al inicio del proceso, origina un proacrosoma que asciende hasta el ápice nuclear, formando allí el acrosoma definitivo.

#### ABSTRACT

In the early stages of the *Murex brandaris* typical spermiogenesis the nucleus, round shaped, shows a granular chromatin pattern. Then, it elongates while the chromatin becomes lamellar. At the end of the spermiogenic process the nucleus twists around its principal axis and the chromatin plates condense, which results in an elongate and highly electrondense nucleus.

The centriole, placed at the nuclear base, originates the axoneme, which moves up inside a nuclear canal, and runs through the nucleus to its apex.

The chondriome, made by single mitochondria in the early stages, fuses together originating at least three mitochondrial bands which are arranged helically around the axoneme.

The Golgi body, originates a proacrosomal body which moving to the nuclear apex, makes the acrosome of the mature spermatozoa.

**Palabras clave:** Neogasterópodos, Espermiogénesis, Espermatozoide típico.

**Key words:** *Neogastropods, Spermiogenesis, Typical spermatozoon.*

#### INTRODUCCION

El proceso espermatogénico implica una secuencia de cambios morfológicos y bioquímicos que tienen escaso paralelismo con los observados y des-

critos en otros tipos celulares (Bacceti y Afzelius, 1976), siendo la espermiogénesis la etapa que registra mayor número de transformaciones, aunque los mecanismos de regulación de dicho proceso no son del todo conocidos (Yasuzumi, 1974).

(\*) Departamento de Bioquímica y Fisiología. Unidad de Biología Celular. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Avda. Diagonal 647, 08028 Barcelona. T: 330 88 51. Ext. 228-181.

Fig. 1. Espermátida en el inicio de la Fase II. Obsérvese la disposición perinuclear de la comatina así como la ubicación de algunas mitocondrias (m) situadas todavía en la zona apical del núcleo (n). 15.045x.

Fig. 2. Espermátida en la Fase II mostrando la disposición periférica de la cromatina así como un acúmulo de la misma en la base nuclear (asterisco). Las mitocondrias, (m), ocupan posición basal, y el axonema recién formado (a) se sitúa en el canal intranuclear. 23.323x

Fig. 3. Típica disposición de los orgánulos celulares en la Fase II de la espermiogénesis. Obsérvese el núcleo (n) invaginado con un acúmulo de cromatina en su base (asterisco), así como la forma de herradura del canal intranuclear. En esta zona pueden observarse el axonema(a), el condrioma (m), y el Complejo de Golgi (g). Obsérvese la presencia de un puente intercelular (asterisco). 23.614x.

Fig. 4. Dictiosoma (g) en la fase inicial de la formación del acrosoma. Obsérvese una vesícula densa (flecha), posiblemente procedente del cuerpo multivesicular formado en estadios anteriores, e íntimamente unida a ella, una vesícula clara (asterisco). 29.400x.

Fig. 5. La vesícula clara de la imagen anterior (asterisco) se ha llenado de material electrodens, apareciendo ahora unida a la vesícula que en la fase anterior ya estaba formada (flecha). Esta vesícula es probablemente la precursora del proacrosoma, así como la de menor tamaño lo es del perforatorium. Próximo a ambas todavía se visualiza un dictiosoma (g). 37.750x.

Las células resultantes, es decir, los espermatozoides, básicamente, y atendiendo a su morfología, se han clasificado tradicionalmente en espermatozoides de tipo primitivo y espermatozoides de tipo modificado, presentando estos últimos acusadas diferencias respecto al tipo primitivo. La formación de ambos tipos de espermatozoides puede coexistir en un mismo grupo zoológico.

Los Gasterópodos filogenéticamente más evolucionados (Meso y Neogasterópodos), además de poseer la línea germinal fecundante denominada eupirena, tienen otra línea no fecundante en que la cromatina nuclear de sus espermatozoides presenta una degeneración parcial (espermatozoides oligopirenos) o degeneración total (espermatozoides apirenos), denominada línea atípica, pseudoespermática o paraspermática. El significado biológico y funcional de esta línea celular ha sido ampliamente discutido sin estar todavía clarificado su papel, siéndole asignadas en la actualidad básicamente dos funciones: la nutricia (Dembski, 1968, Buckland Nicks y Chia, 1976) y la transportadora (Anderson y Personne, 1976, Buckland Nicks *et al.*, 1982), pudiéndose dar ambas a la vez (Bulnheim, 1962, Melone *et al.*, 1980). *Murex brandaris* Neogasterópodo, posee ambas líneas germina-

les, siendo la línea atípica de tipo apireno, y la línea típica de tipo modificado.

Algunos aspectos de la espermiogénesis típica, serán considerados en el presente trabajo.

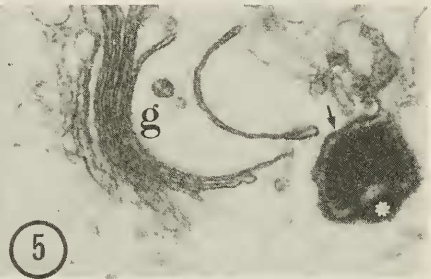
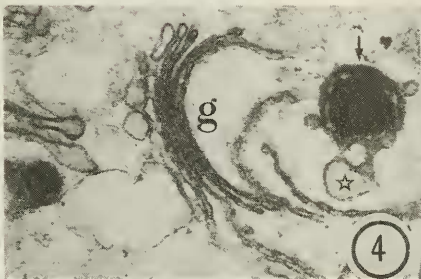
## MATERIALES Y METODOS

Extraídos por disección testículos de varios ejemplares de *Murex brandaris* procedentes de la costa mediterránea, fueron sometidos a los siguientes procesos:

Microscopía óptica: A fin de detectar el grado de madurez del individuo, se procedió a efectuar extensiones de testículo, que fueron observadas bajo microscopía de contraste de fases, tiñéndose posteriormente con la técnica Diff-Quick (Durfort, 1978).

Asimismo, pequeños fragmentos de la misma, se procesaron para la confección de bloques de parafina, siendo teñidos con las técnicas de hematoxilina-eosina, Mallory y hematoxilina férrica-picrofucsina.

Microscopía electrónica: Fragmentos de gónada de 1mm<sup>2</sup> fueron sometidos a la técnica rutinaria de doble fijación con glutaraldehído-paraformaldehído al 2,5% tamponado a pH 7,2-7,4, y tetróxido de osmio al 1-2% en solución tampón, siendo posteriormente incluidos



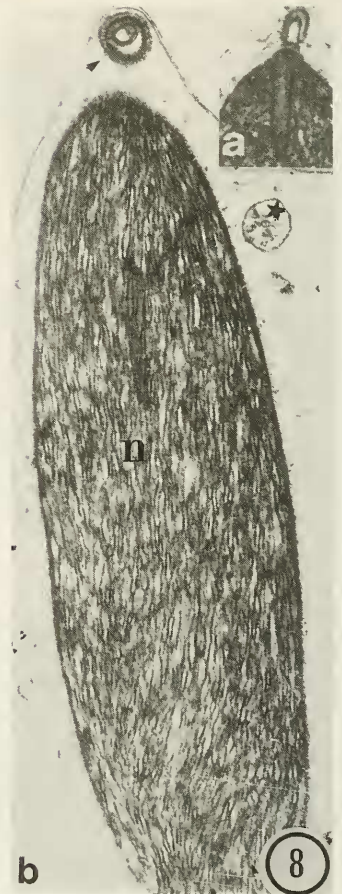
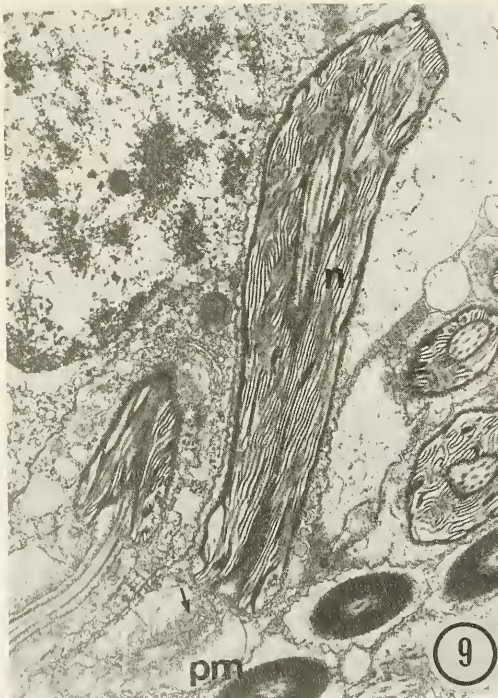
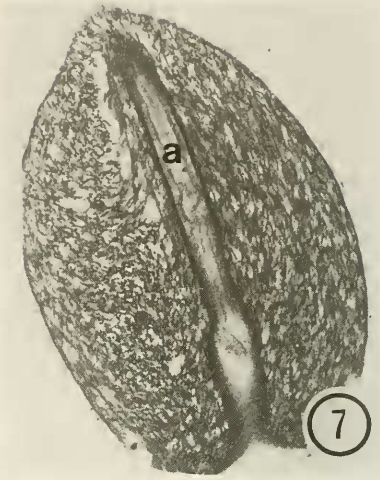
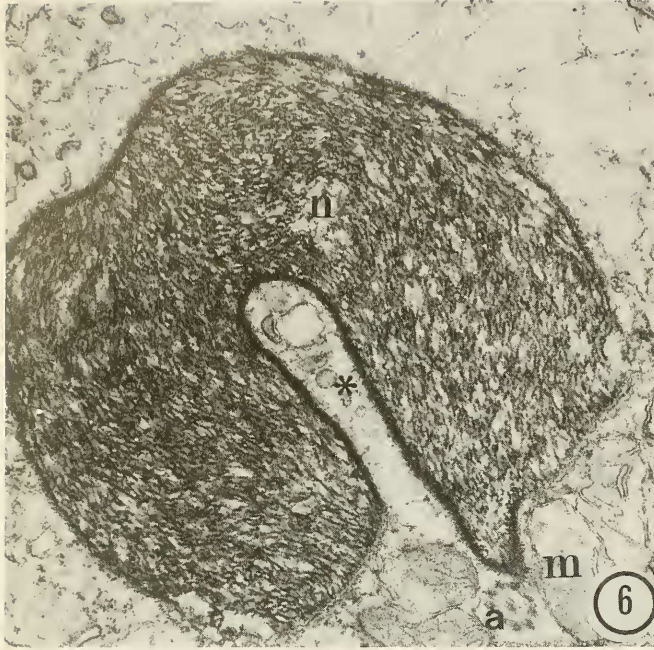


Fig. 6. Espermátida en la Fase III. Puede apreciarse el cambio de patrón de distribución de la cromatina, apareciendo ahora con estructura filamentososa y repartida uniformemente por el carioplasma. Obsérvese el incremento en longitud del canal intranuclear, así como la presencia de unas vesículas en su interior (asterisco). Se observa la zona basal del axonema(a) rodeada de mitocondrias (m) que aún no han iniciado su fusión 25.200x.

Fig. 7. Estadíos finales de la Fase III. Obsérvese el incremento en longitud del canal intranuclear, así como la ascensión del axonema (a) por el mismo. 22.312x

Fig. 8.a: Espermátida Fase IV. Obsérvese el gran alargamiento nuclear, la posición apical del acrosoma joven cortado transversalmente, (flecha), así como la superficie dentada del mismo. En su interior se intuye un esbozo de perforatorium, e iniciando un descenso, un cuerpo multivesicular (asterisco) 23.887x. b: Sección longitudinal del acrosoma en esta fase donde se aprecia su forma ovalada. 10.499x.

Fig. 9. Corte longitudinal de una espermátida en las postrimerías de la Fase IV a nivel del núcleo (n) y de la pieza media (pm). Obsérvese el incremento de rotación de las láminas cromatínicas, así como el engrosamiento de las mismas. En la pieza media se aprecian perpendicularmente al axonema, pequeñas crestas mitocondriales (flecha). 28.088x

en plástico, procediéndose a la técnica rutinaria de la obtención de cortes semifinos teñidos con azul de metileno 1% bórax a fin de seleccionar la zona a cortar.

Los cortes, de unos 300A de grosor, se recogieron en rejillas de cobre y se contrastaron, como es habitual, con acetato de uranilo seguido de citrato de plomo. En técnicas especiales como la de Erenpreisa (1981) destinada a detectar el ADN, los cortes fueron recogidos en rejillas de oro.

En todos los casos, las observaciones se realizaron en un microscopio Philips 200 o Philips 301, del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Barcelona.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Debido a la complejidad que comporta la espermiogénesis, y atendiendo a los cambios ultraestructurales que adopta el núcleo de las espermátidas, diferenciaremos las siguientes etapas:

Fase I: Núcleo recién formado

Fase II: Disposición periférica de la cromatina e inicio de formación del canal axonemático.

Fase III: Disposición fibrilar de la cromatina.

Fase IV: Asociación de la cromatina en láminas y elongación nuclear.

Fase V: Condensación final (total) de la cromatina y formación del espermatozoide maduro.

### Nucleogénesis

El núcleo recién formado (Fase I), presenta la cromatina distribuída uniformemente por el nucleoplasma, apareciendo en algunos casos restos de cromatina condensada. Su tamaño se ha reducido a la mitad del valor que presentaba en fases anteriores, no superando en ningún caso valores superiores a 3 µm de diámetro, recordando las imágenes dadas ya en microscopía óptica por Schitz (1920), en *Aporrhais*, *Ceritium*, *Turritella*, *Bittium*, y *Murex trunculus*, y CAPUIS (1941-42) en *Murex trunculus* y *Murex brandaris*, así como las imágenes ultraestructurales de los trabajos de Yasuzumi y Tanaka (1958), en *Cipangopaludina malleata* Buckland Nicks y Chia (1976) y Buckland Nicks *et al.*, (1983) en *Littorina* y *Fusitriton oregonensis* respectivamente.

Al final de estas fases, la cromatina tiende a adoptar una distribución periférica, que se encuentra totalmente consolidada en la Fase II. (Figs. 1, 2, 3, 19).

Esta distribución periférica no es uniforme, sino que tiene tendencia a acumularse en la base nuclear, en las proximidades del Complejo de Golgi, el centriolo y gran parte del condrioma, siendo en este polo donde se forma una invaginación que dará lugar a un

Fig. 10. Corte transversal de espermátidas en la Fase IV a nivel de los núcleos (n), y de la pieza media (pm). Puede apreciarse la rotación de la cromatina alrededor del axonema que presenta la fórmula 9+2, y en la pieza media, los septos debidos a la rotación de la pieza media. Obsérvese la presencia de pequeñas crestas dispuestas perpendicularmente al axonema (flecha). 18.500x

Fig. 11. Corte transversal de una espermátida en los primeros estadios de la condensación final de la cromatina. Obsérvese la presencia de pequeños puntos de condensación intermedios así como pequeñas bandas en la periferia y en las proximidades del axonema. Se observa un pequeño cuerpo multivesicular con restos de cisternas golgianas (asterisco) y el extremo de un puente intercelular. 19.005x

Fig. 12. Detalle de la implantación del axonema (a) en el ápice del núcleo de una espermátida en la Fase IV. 36.750x

Fig. 13. Ultimos estadios de la total condensación cromatínica. Obsérvese la gran electrodensidad nuclear de la zona condensada, quedando sólo pequeños espacios donde ésta no ha tenido lugar, no observándose ya puentes intercelulares. 36.500x

Fig. 14. Panorámica de las últimas fases de la espermiogénesis poniendo de manifiesto espermátidas donde aún quedan áreas sin condensar (1), espermátidas donde las zonas no condensadas corresponden a pequeños puntos (2), y espermatozoides (e), donde el núcleo es totalmente electrodenso. Obsérvese la condensación de la cromatina en forma de circunferencias concéntricas semejantes a la vaina de mielina (asterisco) y la presencia de un acrosoma (a) cortado transversalmente. Técnica de ERENPREISA. 44.800x

canal intranuclear por donde ascenderá posteriormente el axonema.

Dicho canal tiene forma de herradura ocupando 1/3 del diámetro nuclear. (Figs. 2, 3, 19).

La distribución periférica de la cromatina en las primeras fases de la espermiogénesis ha sido también descrita en otros Prosobranchios por Schitz (1920), Rousset Galangau (1969), Walker (1969), Buckland Nicks y Chia (1976) y Buckland Nicks *et al.*, (1983).

En el inicio de esta etapa, puede todavía apreciarse la presencia de un nucléolo que dejará de visualizarse al final de la misma.

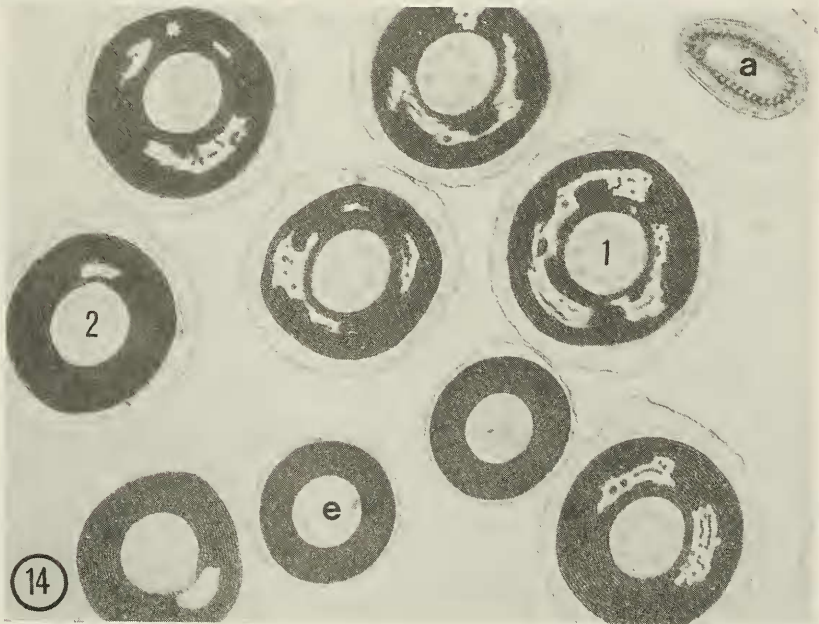
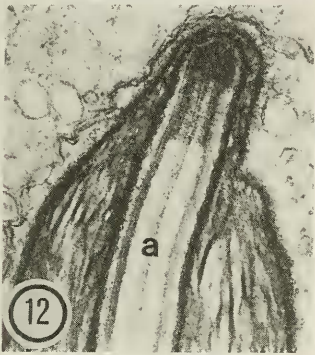
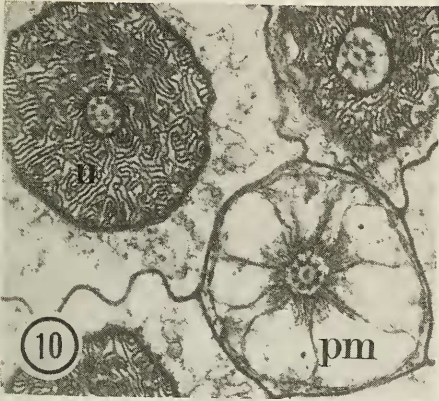
En la Fase III, la cromatina pierde su disposición periférica (Figs. 6, 7, 19) condensándose en fibras que progresivamente se engruesan debido posiblemente a la aposición de otras contiguas repartiéndose uniformemente por todo el carioplasma de manera similar a las imágenes obtenidas por Walker (1969, 1971) y Walker y McGregor (1974) en varios grupos de Prosobranchios, Rousset Galangau (1969) en *Columbella rustica* y *Murex trunculus*, Buckland Nicks y Chia (1976) y Buckland Nicks *et al.*, (1983) en *Littorina* y *Fusitriton oregonensis* respectivamente.

Aunque inicialmente el núcleo es redondeado y presenta características similares a la Fase II, conforme avanza el proceso se inicia una elongación que conlleva el alargamiento del canal axonemático, alcanzando valores de 2,5  $\mu\text{m}$  x 1,7  $\mu\text{m}$  e iniciándose una rotación sobre el mismo. (Fig.7).

Ya desde los primeros estadios de esta fase, el canal intranuclear se alarga, ascendiendo por él el axonema recién formado, siendo precedido por unas vesículas de origen desconocido, semejantes a los datos aportados por Buckland Nicks *et al.*, (1983) en *Fusitriton oregonensis*. (Figs. 6, 7, 19).

La Fase IV viene caracterizada por la organización de la cromatina en láminas (Figs. 8, 9, 10, 19) y el incremento de la rotación nuclear que hace adquirir a la cromatina disposición helicoidal. Al final de la misma, la longitud nuclear alcanza 4,5  $\mu\text{m}$ .

En la Fase V la rotación nuclear se incrementa ostensiblemente, lo que da lugar a la progresiva fusión, por contacto, de las láminas de cromatina de manera similar a como se describe en *Cipangopaludina malleata* (Yasuzumi y Tanaka, 1958), *Nucella*, (Walker, 1969) *Littorina* (Buckland Nicks y Chia,



1976) y *Fusitriton oregonensis* (Buckland Nicks *et al.*, 1983).

Los puntos de fusión aparecen primitivamente en las zonas más externas y más internas del núcleo, es decir, en las zonas limitantes con la membrana plasmática y el axonema, aunque también se aprecian puntos de fusión en las zonas intermedias (Fig.11). Conforme avanza la condensación cromatínica, las láminas se disponen concéntricamente dando lugar a imágenes semejantes a las adoptadas por la vaina de mielina (Amor, 1986). (Fig. 14)

La condensación prosigue centrífuga y centrípetamente a la vez, quedando al final sólo pequeños puntos sin condensar, (Figs. 13, 14), culminando finalmente en vainas de cromatina totalmente condensadas que continúan presentando esta misma disposición concéntrica (Fig.14).

El volumen nuclear a su vez también varía, ya que esta rotación sobre el eje axonemático viene acompañada de un alargamiento y un estrechamiento nuclear. Así, el núcleo que en el inicio de la condensación cromatínica presentaba un diámetro superior a los 0,8  $\mu\text{m}$  no sobrepasa al final valores superiores a 0,6  $\mu\text{m}$  y su longitud, que en el inicio de esta etapa es de 4,5  $\mu\text{m}$  al final de la misma alcanza valores de 5  $\mu\text{m}$ .

En el espermatozoide maduro, como es habitual, la cromatina aparece totalmente condensada y con elevadísima electrodensidad, (Figs. 14, 15, 16, 17, 18, 19), observándose la presencia de microtúbulos perinucleares (Fig.17).

### Génesis de la pieza media

El condrioma, en el inicio de la Fase II puede presentar todavía mitocondrias en forma de "bastoncito" típicas de los espermatocitos de primer y segundo orden, que progresivamente van adquiriendo formas redondeadas a la vez que disminuye su tamaño, no alcanzando valores superiores a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, y, aunque no hemos encontrado imágenes de fragmentación mitocondrial, no descartamos esta posibilidad.

En el inicio de esta fase, ya existe un acúmulo de condrioma en la región pericentriolar (Figs. 2, 3, 19), aunque pueden detectarse algunos agregados en otra área.(Fig. 1)

Esta localización pericentriolar de las mitocondrias hace pensar en un importante aporte energético a fin de formar el axonema y el acrosoma a partir del Complejo de Golgi.

En las siguientes fases, las mitocondrias tienden a fusionarse originando unos cuerpos mitocondriales a modo de "bandas" que rodean el axonema formando una hélice. Cada una de estas "bandas" presenta forma triangular y las crestas, muy cortas, se disponen perpendicularmente al eje axonemático (Fig.9). La "base" de este "triángulo" mide 0,4  $\mu\text{m}$  distando 0,08  $\mu\text{m}$  de la base nuclear. Con estas características hemos podido contar hasta 3 cuerpos mitocondriales.

En secciones transversales, estas "bandas" presentan aspecto de "flor", donde cada pétalo correspondería a un "paso de rosca" dado por las bandas mitocondriales (Fig.10).

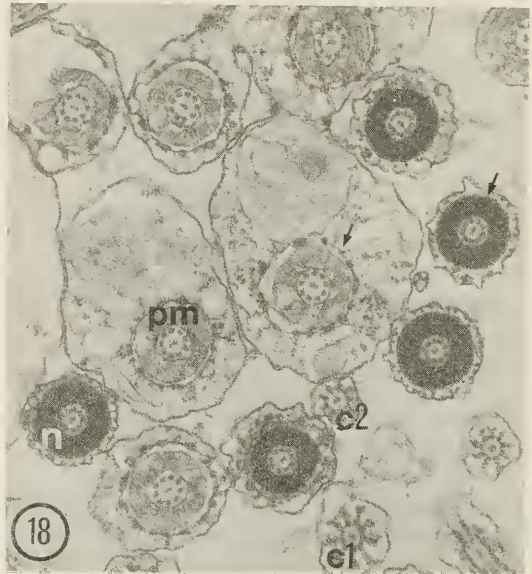
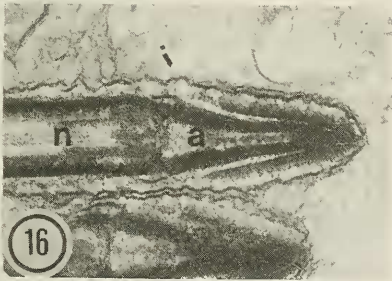
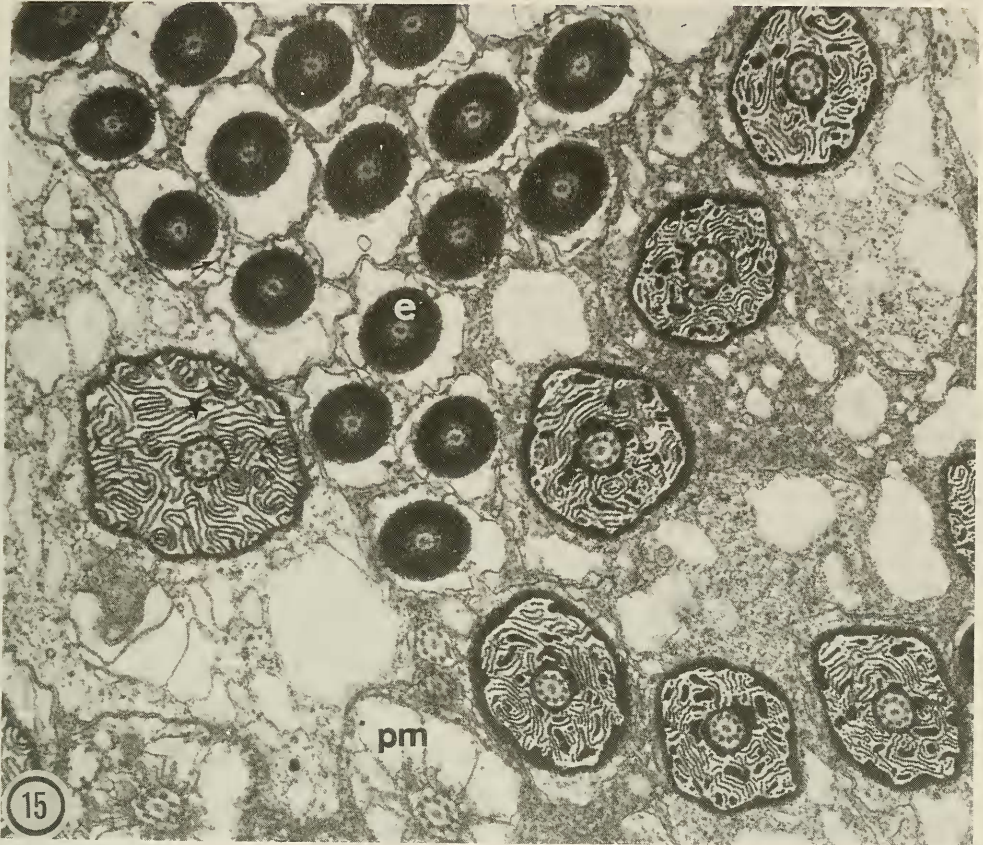
Fig. 15. Panorámica de un tubo seminífero donde se aprecian núcleos de espermátidas en distintas fases de condensación (asterisco), piezas medias de las mismas (pm), y espermatozoides maduros (e). Puede apreciarse la presencia de microtúbulos adosados a las membranas plasmáticas y a los núcleos de los espermatozoides (flecha). 19.782x

Fig. 16. Corte longitudinal del acrosoma de un espermatozoide maduro (a), ubicado en el ápice nuclear (n). 37.333x

Fig. 17. Corte transversal de un núcleo de espermatozoide maduro, mostrando una serie de microtúbulos dispuestos periféricamente a él. 71.399x.

Fig. 18. Espermatozoides maduros cortados a diversos niveles: n: núcleo, pm: pieza media, c1: cola a nivel del tramo superior, c2: cola a nivel del tramo medio. Obsérvese la mayor electrodensidad de la pieza media respecto a la pieza media de las espermátidas, así como el diferente diámetro de la cola a los dos niveles. Se pueden apreciar asimismo, microtúbulos adosados a las membranas plasmática y nuclear (flecha). 11.333x.





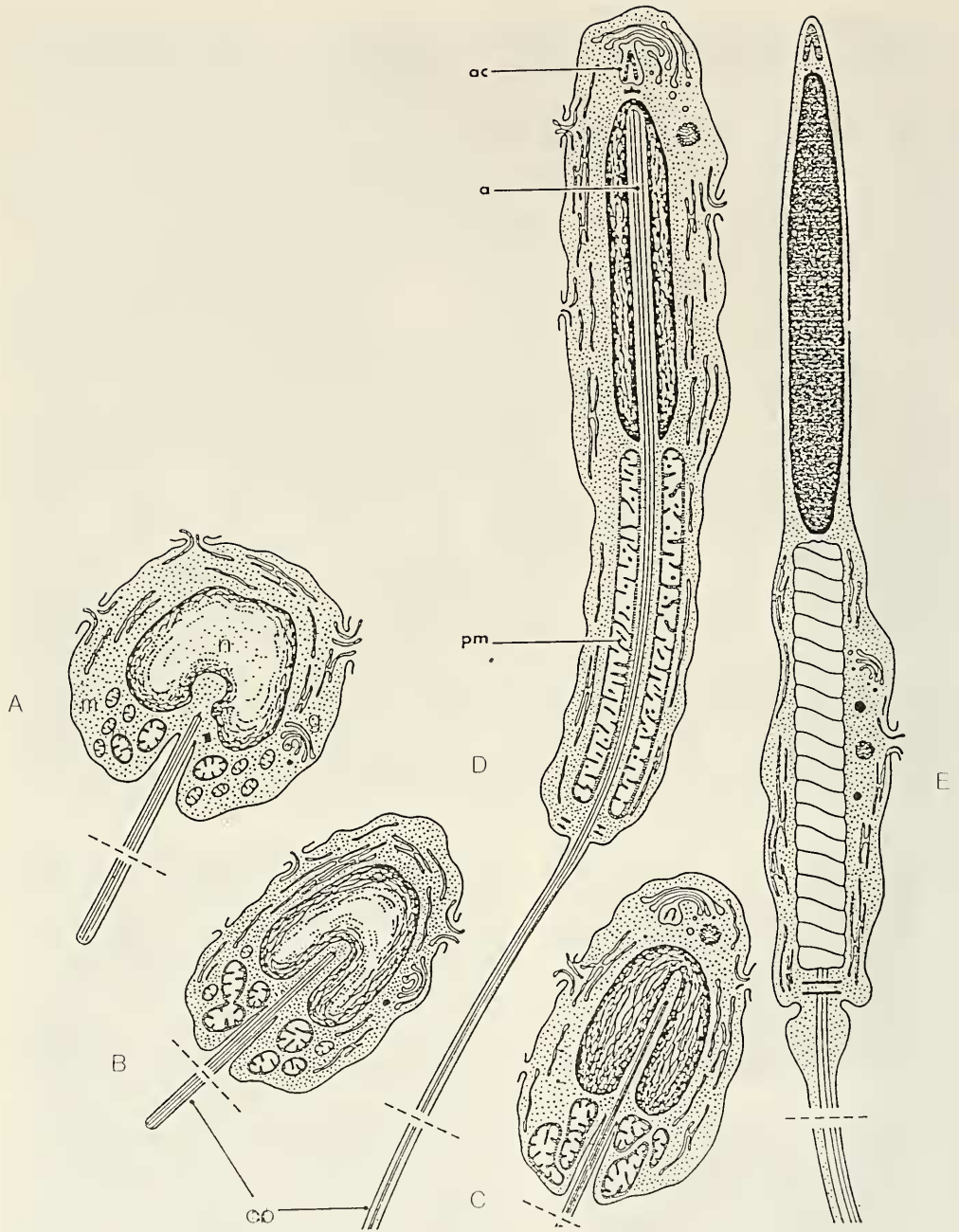


Fig. 19. Esquema de la evolución de los orgánulos celulares en la espermiogénesis típica de *Murex brandaris*: A: Fase II de la espermiogénesis B y C: Fase III D: Fases finales E: Espermatozoide maduro. a: axonema; ac: acrosoma; co: cola; g: Complejo de Golgi; m: condrioma; n: núcleo; pm: pieza media

En las últimas fases de la espermiogénesis (Fase V), la pieza media incrementa su rotación a la vez que se estrecha, culminando en la formación del espermatozoide maduro.

Este proceso corresponde, a grandes rasgos, no sólo al descrito en muchos Prosobranquios (Yasuzumi y Tanaka, 1958, Gall, 1961, Rousset Galangau, 1969, Buckland Nicks y Chia, 1976, y Buckland Nicks *et al.*, 1983), sino también en algunos Pulmonados (Andre, 1962, Rousset Galangau, 1969), aunque en estos últimos se han hallado varios tipos de hélices, hecho que no se presenta en *Murex brandaris* ni en el resto de los Prosobranquios estudiados. Es notorio hacer constar que la pieza media de las espermátidas se presenta totalmente clara, (Fig.10), mientras que la del espermatozoide maduro es algo electrodensa. (Fig. 18).

### Flagelogénesis

Un centriolo único se visualiza en la base del núcleo junto al canal intranuclear, en la Fase II de la espermiogénesis, a diferencia de las fases anteriores en que se observaba la típica estructura de dos centriolos con disposición perpendicular, iniciando este centriolo la formación del axonema (Figs. 2, 3, 19)

En la Fase III, el axonema asciende por el canal intranuclear siendo precedido por unas vesículas de origen desconocido (Figs. 6, 7).

Por no poseer el mismo diámetro en toda su longitud, el canal intranuclear, que en su base mide 0,2-0,3  $\mu\text{m}$ , el axonema, de 0,1  $\mu\text{m}$  de diámetro no lo ocupa de una manera uniforme (Fig.7).

En la Fase IV, el axonema prosigue su ascenso y al final de la misma alcanza el ápice del canal intranuclear, que llena totalmente debido al estrechamiento de éste en su base, posiblemente condicionado por el propio alargamiento del núcleo (Fig.12, 19).

En la zona basal, el axonema se halla rodeado por unas bandas mitocondriales, dando lugar a la pieza media, (Figs.10, 18, 19) y en la región distal forma la cola, que en el espermatozoide maduro está, en su parte proximal, rodeada de abundantes gránulos de glucógeno, cuyo número decrece progresivamente hasta llegar a desaparecer en la zona distal de la misma (Fig.18, 19).

Desde su formación, el axonema presenta la típica fórmula 9+2 (Figs. 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18).

Imágenes semejantes a la flagelogénesis de *Murex brandaris* han sido descritas en *Ceritium*, *Turritella* y *Bittium* (Schitz, 1920), *Viviparus* (GALL, 1961), *Columbella rustica* (Rousset Galangau, 1969), *Littorina* y *Fusitriton oregonensis* (Buckland Nicks y Chia, 1976, Buckland Nicks *et al.*, 1983), *Obtortio fulva* y un amplio grupo de Mesogasterópodos (Healy, 1982).

### Acrogénesis

El complejo de Golgi aparece inicialmente ubicado en las proximidades de la invaginación intranuclear y del condrioma (Fig.3, 19).

En esta fase, está formado por 1-2 dictiosomas que comprenden un número muy variable de cisternas muy curvadas (Fig.3).

Un cuerpo multivesicular formado en la fase de espermatozito de primer orden, se condensa y se mantiene unido a otra vesícula más pequeña (Fig. 4).

Esta segunda vesícula se carga asimismo de material electrodense, formando una estructura que podemos considerar como el proacrosoma, donde la vesícula mayor, con forma de herradura y rodeada por una doble membrana originará el acrosoma propiamente dicho, mientras la segunda vesícula dará lugar al perforatorium (Fig.5).

Esta segunda vesícula asciende junto al complejo de Golgi hasta el ápice nuclear (Fase III) y origina el acrosoma que inicialmente tiene forma ovalada (Fase IV). El complejo de Golgi, reducido a un pequeño dictiosoma, parece aún activo y por tanto, contribuiría a la formación del acrosoma, migra a la base nuclear acompañado a veces de un cuerpo multivesicular que en las fases finales parece ser excitado a nivel de la pieza media (Fig. 11, 19).

Este acrosoma joven, cortado transversalmente, presenta una membrana bastante densa que tanto exterior como interiormente, tiene una superficie dentada. En su interior se aprecia un esbozo del perforatorium (Fig. 8). En las fases finales, dicho acrosoma adopta forma cónica, dando lugar al acrosoma definitivo (Fig. 16) (Amor, 1987).

Durante la espermiogénesis, la membrana plasmática no sufre grandes cambios. Cabe señalar, sin embargo, que en los estadios iniciales y medios, se aprecian, al igual que sucedía en las fases de espermatogonía y espermatocito, puentes intercelulares que se cierran al acabar el proceso (Figs. 3, 11, 13, 14, 15, 18).

## BIBLIOGRAFIA

- AMOR, M.J. 1986.- Cambios nucleares durante la espermatogénesis de *Murex brandaris* (Gastropoda, Prosobranchia). *Biología del Desarrollo* 4:137-151.
- AMOR, M.J. 1987.- Génesis del acrosoma en la espermatogénesis de *Murex brandaris*. *Biología del Desarrollo*, 5:40-51.
- ANDERSON, W. y PERSONNE, P. (1976).- The Molluscan spermatozoon: Dynamic aspects of its structure and function. *Amer. Zool.*, 16:293-313.
- ANDRE, J. 1962.- Contribution à la connaissance du chondriome. Etude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogénèse. *J. Ultr. Res.*, supp.3.
- BACCETTI, B. y AFZELIUS, B.A., 1976.- "The Biology of Sperm Cells". *J. Karger. New York*. pp: 1-118.
- BUCKLAND NICKS, J. y CHIA, F.S. 1976.- Spermatogenesis of a marine snail *Littorina sitkana*. *Cell Tiss. Res.*, 170: 455-475.
- BUCKLAND NICKS, J.; WILLIAMS, D; CHIA, F.S. y FONTAINE, A. 1982.- Studies on the polymorphic spermatozoa of a marine snail. I. Genesis of the apyrene sperm. *Biol. Cell.*, 44:305-314.
- BUCKLAND NICKS, J; WILLIAMS, D.; CHIA, F.S. y FONTAINE, A. 1983.- Studies on the polymorphic spermatozoa of a marine snail. 2. Genesis of the eupyrene sperm. *Gamete Research*, 7:19-37.
- BULNHEIM, H.P. 1962.- Untersuchungen zum spermatozoidmorphismen von *Opalia crenimarginata* (Gastropoda Prosobranchia). *Z. Zellforsch.*, 56: 300-343.
- CAPUIS, G. 1941-42.- Osservazioni sulla gametogenesis dei *Murex*. *Atti del Reale Istituto Veneto di Scienze, Letteri ed Arti.*, T. C.I P II, pp. 60-67.
- DEMBSKI, W.J. 1968.- Histochemische untersuchungen über funktion und verblieb eu-und oligopirener spermien von *Viviparus connectus* (Millet 1813) (Gastropoda, Prosobranchia). *Z. Zellforsch.*, 89:151-179.
- DURFORT, M. 1978.- Un método de tinción policrómico de uso rápido. *Misc. Zool.*, 4: 205-210.
- ERENPREISA, J. 1981.- Staining of DNA uranylacetate in hydrolysed ultrathin sections. *Acta Histochem.*, 68:22-26.
- GALL, J. 1961.- Centriole replication. A study of spermatogenesis in the snail *Viviparus*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, V.10, 2:163-193.
- HEALY, J.M. 1982.- Ultrastructure of paraspermatozoa, cuspermatozoa and sperm-like spermatozoa of *Obolortio fulva*. *Helgoländer meersuntersuchungen. Helgoländer Meeresunters.*, 35:489-500.
- MELONE, G.; LAMIADONIN, C. y COTELLI, F. 1980.- The paraspermatic cell (atypical spermatozoon) of Prosobranchia. A comparative ultrastructural study. *Acta Zool. (Stok)*, 61:191-201.
- ROUSSET GALANGAU, V. 1969.- Etude au microscope électronique de la gametogénèse de *Milax gagates* (Gastropode Pulmoné Limididae). Evolution au cours de la spermatogénèse chez différents types de Mollusques. Thèse. Université de Montpellier.
- SCHITZ, V. 1920.- Sur la spermatogénèse chez *Ceritium vulgatum* Brug, *Turritella triplicata* Brocchi (mediterranea monterosata) et *Bittium reticulatum* Da Costa. *Arch. Zool. Exp. Gen.* 58:489-520.
- SCHITZ, V. 1920.- Sur la spermatogénèse chez *Murex trunculus* L. *Aporrhais pespelicani* L. *Fusus* sp. et *Nassa reticulata* L. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, 59:477-508.
- WALKER, M.H. 1969.- Some unusual features of the sperm of *Nucella lapillus* L. *Comparative Spermatology. Accademia Nazionale Lincei. Reprint from Quaderno*, 137:383-396.
- WALKER, M.H. 1971.- Studies on the arrangement of nucleoprotein in elongate sperm heads. *Chromosoma*, 34:340-354.
- WALKER, M.H. y MCGREGOR, H. 1974.- Chromosomes in elongate sperm heads. Reprinted from "Chromosomes today". *V.I. Proceedings of the Leiden Chromosome Conference*. Published in 1976 by John Wiley and sons. New York, Israel. Universities Press Jerusalem.
- YASUZUMI, G. y TANAKA, H. 1958.- Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. VI: Researches on the spermatozoon dimorphism in a pond snail *Cipangopaludina malleata*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, V.4, nº 5:621-637.
- YASUZUMI, G. 1974.- Electron microscope studies on spermiogenesis in various animal species. *Int. Rev. Cytol.*, 37:53-119.